产气荚膜梭菌促进黑腹果蝇的生长和发育

刘 威[1,2,#,*], 李玉娟[1,3,#], 刘晓梁[1], 卓 萍[1,2], 姚 红[3,*]

(1. 山西医科大学汾阳学院科技中心, 山西汾阳 032200; 2. 山西医科大学汾阳学院医学检验系, 山西汾阳 032200; 3. 山西医科大学基础医学院微生物与免疫学教研室, 太原 030001)

摘要:【目的】黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 肠道中栖生着众多微生物,通过分离和研究其内共生菌,以研究肠道菌群的多态性和作用。【方法】利用 Hungate 滚管技术从黑腹果蝇成虫肠道分离厌氧细菌;通过记录果蝇的发育历期和生长速率,检测该细菌对果蝇发育和生长的影响。【结果】首次从黑腹果蝇肠道内分离到一株产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens*。该菌能够有效地定植到果蝇肠道内,是果蝇肠道共生菌。产气荚膜梭菌显著地缩短无菌果蝇的发育历期,将无菌果蝇成蛹天数由 20 d 缩短到 8.1 d,羽化天数由 30 d 缩短到 12.7 d。该菌还可以提高果蝇生长速率。【结论】本研究揭示了产气荚膜梭菌是果蝇的内共生菌,可以通过提高生长速率而有效地促进果蝇的生长和发育。

关键词: 产气荚膜梭菌; 黑腹果蝇; 共生菌; 发育; 生长速率

中图分类号: Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2016)05-530-08

Clostridium perfringens promotes the growth and development of *Drosophila melanogaster*

LIU Wei[1,2,#,*], LI Yu-Juan[1,3,#], LIU Xiao-Liang[1], ZHUO Ping[1,2], YAO Hong[3,*] (1. Science and Technology Center, Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi 032200, China; 2. Department of Medical Laboratory Science, Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi 032200, China; 3. Department of Microbiology and Immunology, School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract:【Aim】To isolate and investigate the microbiota from *Drosophila melanogaster* gut harboring substantial numbers of commensal microorganisms, and to further reveal the diversity and functions of microbial communities.【Methods】Anaerobic bacteria from the gut of *D. melanogaster* adults were isolated with Hungate roll tube technique. The symbiotic bacteria were assayed with colonization testing. The effects of the bacteria on developmental time and growth rate of *D. melanogaster* were detected.【Results】We first isolated one strain of the anaerobic bacteria (*Clostridium perfringens*) from *D. melanogaster* gut. *C. perfringens* is able to colonize the fly gut and could be maintained in fly breeding medium, suggesting that it is a commensal bacterium of *Drosophila*. Furthermore, *C. perfringens* stimulated the development of germ-free *D. melanogaster* by shortening its developmental time: shortening pupal formation from 20 d to 8.1 d and adult eclosion from 30 d to 12.7 d, respectively. *C. perfringens* also accelerated the growth rate.【Conclusion】The study revealed that *C. perfringens* is the commensal bacteria of *D. melanogaster*, and has the promoting effect on the growth and development of *D. melanogaster* via promoting its growth rate.

Key words: *Clostridium perfringens*; *Drosophila melanogaster*; commensal bacteria; development; growth rate

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501175); 山西医科大学汾阳学院人才引进科研启动基金(1423); 分子发育生物学国家重点实验室开放课题(2016-MDB-KF-13)

作者简介: 刘威, 1982 年 6 月生, 江苏徐州人, 博士, 专业方向为发育生物学, E-mail: weil988@sina.com; 李玉娟, 1985 年 10 月生, 山东聊城人, 硕士研究生, 专业方向为医学免疫学, E-mail: 1095492525@qq.com

共同第一作者 Authors with equal contribution

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: weil998@sina.com; yyao1976@126.com

收稿日期 Received: 2015-12-04; 接受日期 Accepted: 2016-04-20

后生动物（metazoans）肠道是一个开放和动态的微生态系统，包括肠道、微生物及环境因子。这些肠道微生物通过宿主-微生物和微生物-微生物之间关系网，广泛地影响宿主的生理功能（Tremaroli and Bäckhed, 2012）。它们不仅扩大了宿主的食物来源和利用率，而且产生许多功能性物质，如短链脂肪酸和维生素等，进而调节宿主的代谢和免疫，并且与人类的疾病紧密联系，如糖尿病、肥胖症、肠道炎，甚至癌症等（刘威等, 2006），因此近年来正成为研究热点之一。

黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 作为一种模式生物，遗传可操作性强，是一个优秀的遗传与发育模型（Liu *et al*., 2012），在现代生命科学和医学研究中发挥着重要的作用。和高等动物一样，常规饲养（conventionally reared, CR）果蝇的肠道也栖息着大量的共生微生物，因此它也是一个无菌（germ free, GF）或者悉菌（gnotobiotic）的好模型（Ryu *et al*., 2008）。近年来，研究表明肠道微生物对果蝇生长和发育有着重要的影响（Shin*et al*. 2011; Lee and Brey, 2013）。首先，果蝇喜食腐烂的水果，其内含有大量的发酵微生物（Lee *et al*., 2013），说明这些微生物可能对果蝇发育和生长有益处（Erkosar *et al*., 2013）。其次，果蝇体外排卵，卵外包裹着一层几丁质，可以抵御一定的物理和化学处理，所以可以通过体表消毒法，便捷地建立无菌宿主。在无菌的基础之上，接种特异细菌，高效地建立悉菌模型。再次，果蝇肠道微生物结构与人肠道微生物相似，具有一定的保守性。最后，可借助果蝇强大的遗传学操作优势，有利于解析微生物调控宿主的分子机制。总之，果蝇是一个研究宿主与微生物相互作用的优秀模型，有望使我们深入了解细菌代谢物通路，研究宿主蛋白如何特异识别某一细菌代谢产物以及下游信号通路产生的生理效应。

研究表明，实验室饲养的果蝇肠道主要栖生着5种共生菌，分别为共栖肠杆菌 *Commensalibacterintestini*，苹果醋杆菌 *Acetobacter pomorum*，莫氏葡糖杆菌 *Gluconobacter morbife*，植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 和短乳杆菌 *Lactobacillus brevis*（Shin *et al*., 2011），其中主要为醋杆菌属 *Acetobacter* 和乳杆菌属 *Lactobacillus*。然而，基于非培养依赖的PCR测序技术，发现果蝇肠道细菌种类远远多于我们的预料（Cox and Gilmore, 2007）。考虑到果蝇在世界范围内生存环境的多态性，可能自然界会有更多的肠道微生物未被发现。同时，上述研究基于有氧分离细菌（Shin *et al*., 2011），得到的为需氧菌和兼性厌氧菌，因而会错过分离厌氧菌的机会。因此，我们尝试使用厌氧分菌技术从果蝇肠道内分离厌氧微生物，以研究肠道菌对果蝇发育和生长的影响。厌氧分菌目前常用 Hungate 滚管技术，它已成为一种研究厌氧菌有效的技术和方法。

本研究运用 Hungate 滚管技术，首次从黑腹果蝇肠道分离到一种厌氧菌，经鉴定为产气荚膜梭菌 *Clostridium perfringens*，并证明该菌是果蝇肠道共生菌；通过悉菌模型，研究产气荚膜梭菌对果蝇的发育历期和生长速率的影响，发现产气荚膜梭菌提高果蝇生长速率，说明产气荚膜梭菌是果蝇正常发育必需的共生菌。本研究围绕肠道微生态新兴学科，解析果蝇肠道菌的多样性和功能，具有重要的理论和技术突破，同时也将为人体与微生物互作机理提供新的见解，为预防和治疗相关疾病提供一定科学依据。

1　材料与方法

1.1　供试菌株和昆虫

产气荚膜梭菌和乳植杆菌均为本实验室分离和鉴定；果蝇品系为野生型黑腹果蝇 Oregon R，由中国科学院遗传与发育生物学研究所张永清研究员馈赠。所有的果蝇均在25℃，相对湿度50%，光周期为12L∶12D条件下培养。果蝇培养基为酵母-玉米琼脂培养基，其成分如下（1 000 mL）：ddH_2O 1 350 mL；琼脂 13 g；$CaCl_2$ 0.83 g；蔗糖 31.6 g；葡萄糖 63.2 g；玉米粉 77.7 g；酵母粉 24 g；防腐剂（酒石酸钾钠、尼泊金丁酯）。为了避免酵母粉含有微生物因子对果蝇发育影响，利用酪蛋白水解物代替酵母粉（Shin *et al*., 2011）。水解酪蛋白-玉米琼脂培养基：用不同浓度水解酪蛋白代替酵母粉，同时不添加防腐剂，其余成分和酵母-玉米琼脂培养基相同。

1.2　试剂与仪器

Taq 聚合酶（大连宝生物）；消毒剂威露士（广州威莱，有效成分为对氯间二甲基苯酚）；次氯酸钠（Sigma）；水解酪蛋白（Oxford）；紫外可见分光光度仪（岛津, UV-1800）；37℃恒温培养箱（新苗, GNP9080BS-Ⅲ）；25℃恒温恒湿培养箱（恒丰, WS-01Y）；厌氧装置系统（南京金正）。

1.3　细菌的分离与鉴定

取15头成年果蝇，解剖肠道置于1.5 mL EP管中，70%乙醇消毒2次，磷酸缓冲液清洗2次后，加100 μL 磷酸缓冲液研磨碎后注入厌氧滚管中，使用

补充葡萄糖的 YCFA 培养基,置 37℃恒温箱过夜培养,细菌分离方法参考刘威等(2007)。待长出单克隆菌落,接种环挑出,提取 DNA,使用 PCR 仪(Thermo, PX2)扩增 16S rRNA 基因,送样测序(上海生工)。细菌 DNA 提取和 16S rRNA 基因克隆与测序方法参见刘威等(2007)。将 16S rRNA 基因序列提交 GenBank,获取该株菌登录号。从 GenBank 数据库中下载相关 9 株菌的 16S rRNA 基因序列。基于 16S rRNA 基因的同源性,使用 MEGA 6.0 软件中 Neighbour-Joining 法绘制进化树。

1.4　无菌(GF)果蝇和悉菌模型的建立

酵母膏育肥雌果蝇,用葡萄汁-琼脂板收集 10 h 内卵,无菌水清洗表面的酵母膏,1∶30 稀释的威露士消毒液处理 3 次,1 min/次,然后 1∶1 稀释的次氯酸钠消毒 1 min,70% 乙醇消毒 2 次,1 min/次,1‰ TritonX-100 磷酸缓冲液清洗 1 次,将消毒后卵转移到高压灭菌后的果蝇食物上,用透气不透菌的塞子密封玻璃管,放置到清洁培养箱内培养,建立无菌果蝇(Shin *et al*., 2011)。为了确保无菌,我们通过涂板法检测起初和实验样本是否有细菌污染,如有污染将弃掉被污染样本。

在无菌果蝇基础之上,取 1 OD 产气荚膜梭菌和乳植杆菌菌液 1 mL 到 EP 管中,使用冷冻离心机(上海力申,Neofuge 13R)4 000 r/m 离心 3 min,弃上清,磷酸缓冲液洗 1 次,以除去细菌培养残液。在生物安全柜内将细菌分别加入果蝇食物中,建立果蝇与单一细菌共悉生模型,每次至少做 5 小管。

1.5　产气荚膜梭菌定植果蝇肠道

使用 0.5% 酪蛋白饲养果蝇,产气荚膜梭菌建立悉菌模型之后,分别在 2 龄、3 龄幼虫,蛹,初羽化成虫和成熟成虫各取 6 头,70% 乙醇消毒 2 次,磷酸缓冲液洗 1 次,研磨虫体,梯度稀释混合液,用于肠道内生菌计数。该菌株为兼性厌氧菌,在有氧条件下可在 NA 培养基上生长,因此使用 NA 琼脂培养基涂板计数肠道细菌数量(Guo *et al*., 2014)。在此菌接种后 2, 4 和 14 d,取 0.1 g 培养基,按照上述方法涂板计数果蝇培养基中细菌数量。

1.6　果蝇发育历期和结构测定

将常规饲养(CR)、无菌(GF)和悉菌 3 组卵均接种到酪蛋白 0.1%, 0.3% 和 0.5% 培养基中,每天计数蛹和成虫出现的天数,最后计算果蝇平均化蛹和羽化的时间。

将 CR、GF 和悉菌 3 组卵均接种到 0.5% 酪蛋白培养基中,测量产卵后 144 h 龄幼虫长度,待到成虫,从小管中挑出果蝇,−20℃冰冻处理 1 h,然后在显微镜下拍照。实验 ImageJ 软件测量成虫翅面积、细胞数、细胞尺寸并计数[果蝇翅细胞比较特别,每个细胞会长出一根毛发,所以可以用显微镜拍摄图片后计数毛发根数可知翅细胞数量,参考 Liu 等(2012)]。

1.7　幼虫体表面积测定

自产卵后第 3 天起,每日从食物中挑选 10 头果蝇幼虫,直至蛹出现为止。将幼虫速冻处死,用 ddH_2O 封片以备观察。利用体式显微镜采集幼虫上表面和侧面图片,利用 ImageJ 软件计算每只幼虫的表面积,通过像素点表示表面积。

1.8　数据统计与分析

本实验重复 3 次及以上,对肠道菌数量、发育历期、翅面积、翅细胞数及幼虫体表面积进行统计,以每组数据的平均值进行数据统计,采用 *t* 检验。

2　结果

2.1　黑腹果蝇肠道细菌的分离与鉴定

我们使用 Hungate 滚管技术分离到一株兼性厌氧菌,经染色鉴定为革兰氏阳性球型,与《伯杰细菌鉴定手册》(Garrity *et al*., 2004)中梭菌 *Clostridium* 的特征相似。分子生物学鉴定:16S rRNA 基因共测出的有效长度为 890 bp,在 GenBank 中的登录号为 KU216210。通过 16S rRNA 基因比对,发现该菌株与分离于污泥里的 *C. perfringens* 关系最紧密,同源性高达 99%,我们将其命名为 *C. perfringens* FY1。该菌株与亲缘关系较近的 7 株细菌的系统进化树见图 1,并且与已知的果蝇肠道内醋酸杆菌和乳酸杆菌有较远的亲缘关系。据我们所知,这是首次从果蝇肠道内分离到梭菌属菌株,说明果蝇和人类的肠道微生物区系有一定的保守性。

2.2　产气荚膜梭菌在黑腹果蝇肠道中的定植

为了证明该菌为果蝇的共生菌,我们首先检测这株细菌能否在果蝇肠道内定植。在含有 GF 果蝇卵的培养基接种细菌,然后在果蝇不同发育阶段检测肠道内细菌定植的数量。我们发现果蝇肠内能够定植大量的共生菌-乳植杆菌(阳性对照)(Storelli *et al*., 2011),其每个肠道细菌数量约为 10^5(图 2: A)。产气荚膜梭菌和乳植杆菌类似,在果蝇发育各个阶段均可以检测到产气荚膜梭菌,肠道载菌量约为 10^3(图 2: A),说明产气荚膜梭菌是一种果蝇共生菌。肠道载有产气荚膜梭菌数量呈一种动态变化,

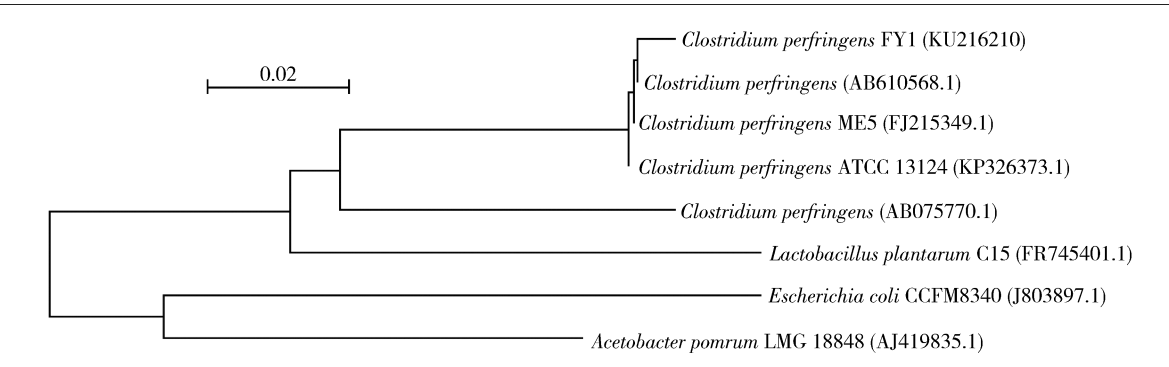


图 1　产气荚膜梭菌与其他相关细菌的系统进化树

Fig. 1　Phylogenetic tree of *Clostridium perfringens* and other related bacteria

标尺示序列差异的分支长度；括号内为 GenBank 数据库的登录号。Scale bar indicates the nucleotide divergence. The GenBank accession numbers are in parentheses.

在 3 龄幼虫期达到顶峰，数量为 4.7×10^4，随后略有降低，并且最终稳定下来。气荚膜梭菌的定植与乳酸菌数量类似，但在各个时期比乳酸菌低。我们进一步发现，产气荚膜梭菌和乳植杆菌均可以在培养基中稳定地繁殖（图 2：B），进一步证明产气荚膜梭菌是果蝇一种共生菌。

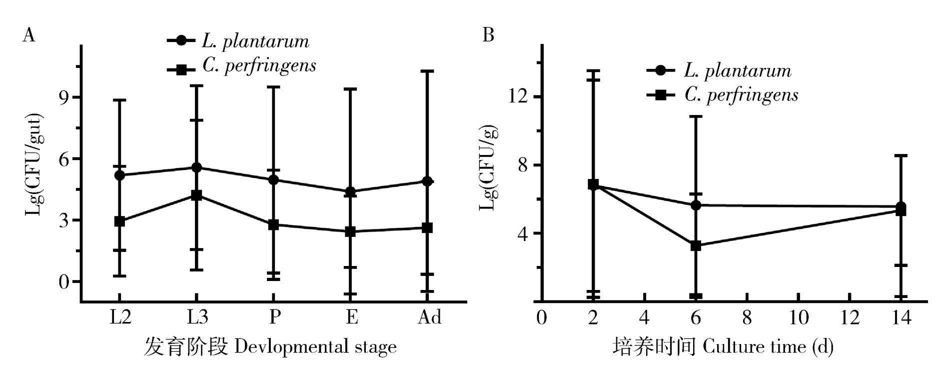


图 2　产气荚膜梭菌和乳植杆菌在黑腹果蝇肠道中的定植

Fig. 2　Colonization of *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus plantarum* in the gut of *Drosophila melanogaster*

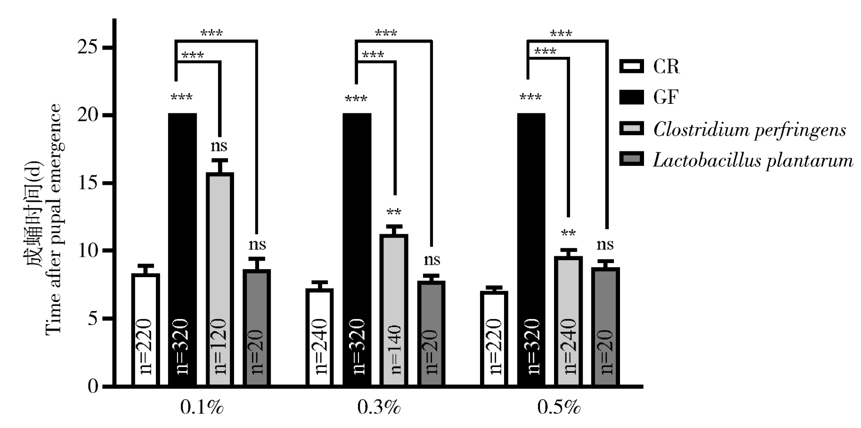
A：产气荚膜梭菌在果蝇肠道内定植。无菌果蝇卵分别接种产气荚膜梭菌和乳酸杆菌，检测果蝇相应阶段肠道载菌量。Colonization of *C. perfringens* in the *Drosophila* gut. *C. perfringens* and *L. plantarum* were inoculated to the eggs of germ free (GF) flies, and the number of bacteria per gut was assessed. L2：2 龄幼虫 2nd instar larva；L3：3 龄幼虫 3rd instar larva；P：蛹 Pupa；E：初羽化成虫 Newly eclosed adult；Ad：成虫后期 Late adult. B：产气荚膜梭菌在培养基中增殖。产气荚膜梭菌和乳酸杆菌接种到 GF 果蝇培养基中，检测培养基细菌密度。Colonization of *C. perfringens* in the medium. *C. perfringens* and *L. plantarum* were added to the medium of GF flies, and the number of bacteria in the medium was assessed.

2.3　产气荚膜梭菌对黑腹果蝇发育历期的影响

果蝇不同阶段发育所需的时间是检测果蝇发育状况最重要的指标。在 25℃ 条件下，CR 卵在产卵后第 6 天就可以成蛹，大约第 11 天羽化出成虫，完成一个世代。我们发现，0.5% 酪蛋白就提供足够的营养供 CR 果蝇正常发育，成蛹和羽化分别需要 7.2 和 12.1 d（图 3：A 和 B）。随着蛋白浓度降低，略微会延长果蝇的发育历期。然而，GF 果蝇发育历期大大地被延迟，成蛹和羽化分别长达 20 和 30 d（图 3：A 和 B），说明了肠道微生物是果蝇正常发育所必需的。在 3 个酪蛋白浓度梯度下，产气荚膜梭菌均显著地缩短 GF 果蝇成蛹和羽化时间（图 3：A 和 B）。特别在 0.5% 酪蛋白条件下，其促生长作用最明显，成蛹和羽化分别为 8.1 和 12.7 d，和乳酸菌相当。结果说明产气荚膜梭菌具有促进果蝇发育的作用（图 3：A 和 B）。

2.4　产气荚膜梭菌对黑腹果蝇尺寸和器官大小的影响

尽管 GF 果蝇在 0.5% 酪蛋白食物上发育历期增加，但是让其继续生长，仍然能够到达特定的龄期虫体，比如蛹和成虫。结果显示，GF 成虫身体尺寸（图 4：A）和翅大小（图 4：B 和 C）与 CR 之间的差异不显著，说明产气荚膜梭菌不影响最终身体大小。我们进一步发现，CR 组果蝇翅细胞数目也与 GF 组无差异（图 4：E），说明产气荚膜梭菌不影响最终器官大小和细胞增殖。



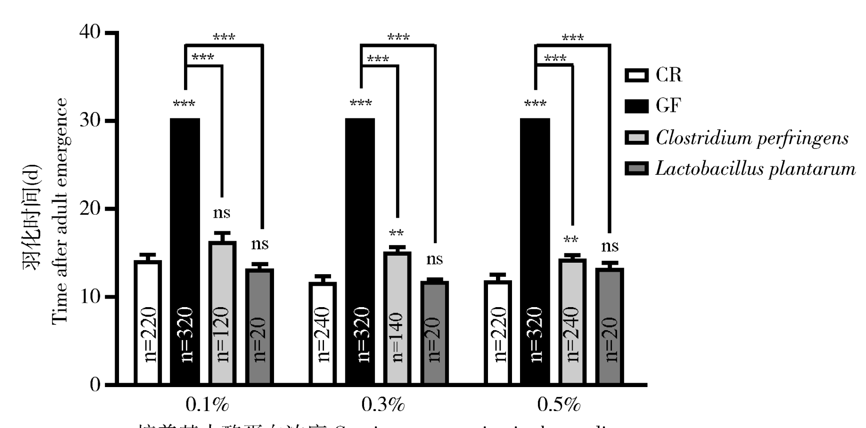


图 3 产气荚膜梭菌促进黑腹果蝇蛹的形成(A)和成虫羽化(B)

Fig. 3 *Clostridium perfringens* stimulates the pupal formation (A) and adult eclosion (B) of *Drosophila melanogaster*

CR：常规饲养 Conventionally reared；GF：无菌 Germ free. 图中数据为平均值 ± 标准误，采用 *t* 检验进行统计分析。Data in the figure are mean ± *SE*, and significant difference was test by *t* test . ns：差异不显著 No significant difference；*：$P<0.05$；**：$P<0.01$；***：$P<0.001$. 图 4 和 5 同 The same for Figs. 4 and 5.

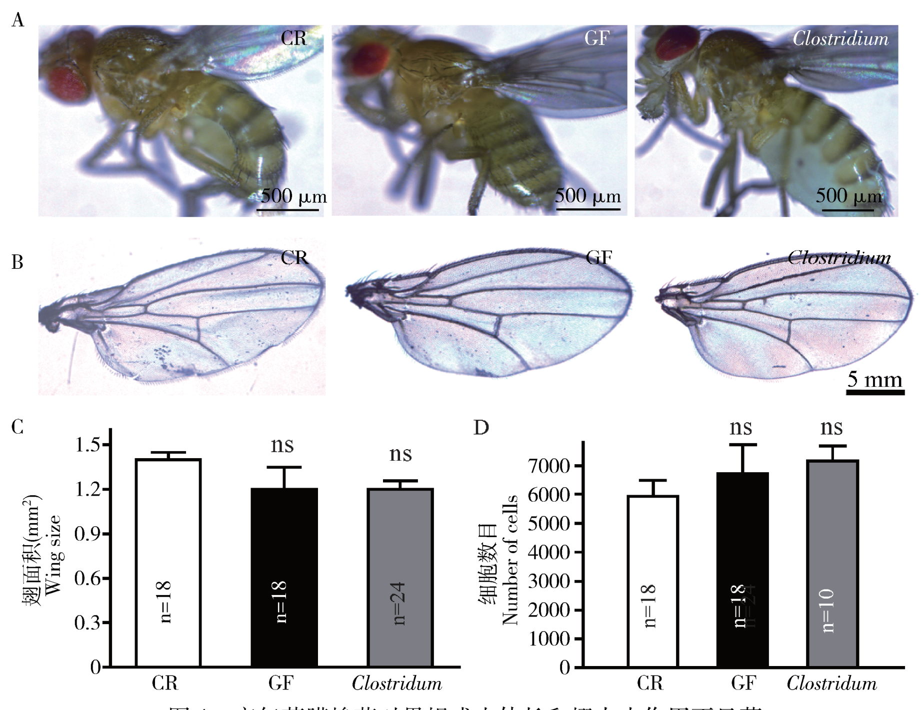


图 4 产气荚膜梭菌对果蝇成虫体长和翅大小作用不显著

Fig. 4 *Clostridium perfringens* has no effects on the size of adult body and wing

A：成虫体长 Adult body length；B：翅大小 Wing size；C：翅面积 Quantification of wing size；D：翅细胞数目 Quantification of wing cell number.

2.5 产气荚膜梭菌对黑腹果蝇生长速率的影响

尽管该微生物不影响果蝇最终身体和器官大小,但是 GF 发育时间长于 CR 组,提示微生物通过影响宿主生长速率而加速果蝇发育。在 0.5% 酪蛋白饲养条件下,GF 果蝇身体尺寸比同日龄 CR 组小。例如产卵后 144 h,CR 果蝇发育到 3 龄期幼虫,果蝇体长约为 2.6 mm(图 4：A 和 B),和酵母上饲养的类似,然而,此时 GF 幼虫仍然处于 1 或者 2 龄期,约为 0.8 mm (图 5：A 和 B),身体长度远远小于 CR,仅为相同日龄 CR 的 1/3。补充产气荚膜梭菌能显著地增加幼虫体长,平均体长为 3.1 mm,甚至大于 CR 幼虫体长(图 5：A 和 B)。

为了动态观察果蝇生长速率,我们利用经典的测定果蝇幼虫体表面积方法评定果蝇的生长速率。结果显示,在幼虫早期,GF 体表面积增长速度与 CR 相当(图 5：C),差异不显著可能源于早期发育部分营养来自于卵,属于母体效应。但是随着日龄增加,CR 体表面积增长加速,显著地快于 GF 组(图 5：C)。产气荚膜梭菌组生长速率与 CR 组相当(图 5：C),也显著地快于 GF 组,说明产气荚膜梭菌可以增加果蝇生长速率。

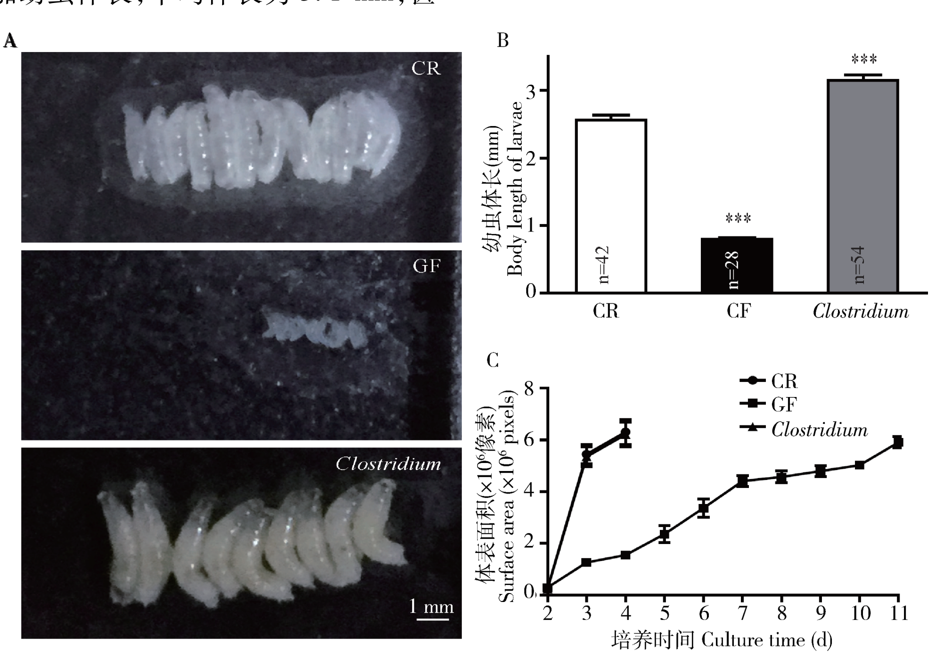


图 5 产气荚膜梭菌促进黑腹果蝇幼虫的生长速率

Fig. 5 *Clostridium perfringens* promotes the growth rate of *Drosophila melanogaster* larvae

A：在 3 种条件下(CR，GF 和 *C. perfringens*)产卵后第 6 天幼虫的身体尺寸 Body size of larvae 6 d after egg laying under the three conditions (CR, GF and *C. perfringens*)；B：果蝇体长数据统计 Quantification of larval body length；C：幼虫身体表面积随着日龄(d)的曲线图,果蝇培养使用 0.5% 酪蛋白培养基 Curve of larval surface over time (d) when larvae grew on 0.5% casein-containing fly food.

3 讨论

因为微生物群落的相对简单性和建立悉菌宿主的简洁性,果蝇为我们提供一个特别的模型,这个模型避免了复杂性,并且非常适合揭示菌群调制宿主生理的分子机制,从而解决这个领域的挑战性问题(Erkosar*et al.*, 2013)。研究结果表明肠道微生物对果蝇发育具有重要的影响,果蝇消化道内细菌菌群相对简单,优势菌群为厚壁菌门(Firmicutes),代表性醋酸杆菌属和乳杆菌属(Shin *et al.*, 2011)。当考虑到果蝇的生长环境差异很大,可能它们的共生微生物远比我们预期的复杂。据我们所知,我们首次在果蝇肠道中发现和报道产气荚膜梭菌,为果蝇肠道微生物又增加了一个新菌种,进一步揭示了果蝇肠道菌的多样性和复杂性。产气荚膜梭菌缩短 GF 果蝇发育历期和提高生长速率,因此它是果蝇正常发育和生长必需的肠道菌之一,加深了我们对肠道菌对果蝇生长和发育作用的认识。

产气荚膜梭菌在自然界中广泛存在,常发现于土壤,植物腐殖质,海洋沉积物及人类和其他脊椎动物、昆虫等肠道内(Shimizu *et al.*, 2002)。尽管某些产气荚膜梭菌是人的病原菌,但是我们的研究表明,产气荚膜梭菌是一种果蝇的肠道内共生菌。一方

面,产气荚膜梭菌基因组有编码降解碳水化合物和蛋白的酶类基因(Shimizu*et al*., 2002),这些酶在体外就可以消化食物,从而提高果蝇对营养物质利用,同时也可以在肠道内继续发挥消化作用,并且刺激果蝇肠道分泌消化酶(Erkosar *et al*., 2015),最终促进了果蝇的生长和发育。这种微生物促生长效果在营养匮乏时更加明显:用低营养食物饲养,GF 果蝇发育延迟增加了 6 d,重新接种微生物又加速果蝇发育生长(Shin *et al*., 2011)。营养匮乏在自然界里频繁发生,所以离开了这些共生微生物,动物生存是不可能的(Kaiko and Stappenbeck, 2014)。最近有一种新的全基因组(hologenome)理论(Kaiko and Stappenbeck, 2014),这个理论认为共生体(宿主和其相关联的微生物)在进化中作为一个选择单元,以适应环境共同进化。我们的结果提示,产气荚膜梭菌提高了与果蝇共生体对外界环境的适应性。

肠道微生物主要通过生长速率而非通过增大个体和器官体积而实现的。我们研究发现,产气荚膜梭菌可以显著地提高果蝇生长速率(图 5),但是对果蝇身体和器官大小影响甚微(图 4)。产气荚膜梭菌扩大果蝇食物来源,提高食物利用效率,特别在营养匮乏条件下,肠道菌不仅水解食物,形成果蝇容易利用的物质,而且可以刺激果蝇肠道分泌消化酶(Erkosar *et al*., 2015),增强果蝇对营养物质的吸收,从而提高果蝇的生长速率。但是研究发现,动物的大小在物种内是非常恒定,机体经常调整生长程序和/或其成熟历期,以补偿生长障碍(如损伤或肿瘤),最终确保正常的大小(Garelli *et al*., 2012)。GF 果蝇尽管获得可利用食物少,但是可以通过延长时间以积累营养物质,只有果蝇达到一定的器官和身体大小,才能进入下一个阶段。所以,我们推论,产气荚膜梭菌主要通过生长速率而促进果蝇发育和生长。

总之,我们的研究表明,产气荚膜梭菌是果蝇的天然共生菌,对果蝇的发育和生长至关重要。目前人们已经发现肠道菌对果蝇其他生理会有影响,比如代谢、衰老以及应激反应(Biteau *et al*., 2010; Brummel *et al*., 2004),产气荚膜梭菌在这些方面是否有作用,有待进一步的研究。同时,我们的研究也说明,果蝇-细菌模型是一个优秀的研究遗传和发育工具,可以探索微生物和宿主之间关系,增进我们对微生物重要性的认识。

参考文献(References)

Biteau B, Karpac J, Supoyo S, Degennaro M, Lehmann R, Jasper H, 2010. Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genet*., 6(10): e1001159.

Brummel T, Ching A, Seroude L, Simon AF, Benzer S, 2004. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(35): 12974 – 12979.

Cox CR, Gilmore MS, 2007. Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. *Infect. Immun*., 75(4): 1565 – 1576.

Erkosar B, Storelli G, Defaye A, Leulier F, 2013. Host-intestinal microbiota mutualism: "learning on the fly". *Cell Host Microbe*, 13(1): 8 – 14.

Erkosar B, Storelli G, Mitchell M, Bozonnet L, Bozonnet N, Leulier F, 2015. Pathogen virulence impedes mutualist-mediated enhancement of host juvenile growth via inhibition of protein digestion. *Cell Host Microbe*, 18(4): 445 – 455.

Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, Caparros E, Dominguez M, 2012. Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science*, 336: 579 – 582.

Garrity G, Bell J, Lilburn T, 2004. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, New York. 141 – 144.

Guo L, Karpac J, Tran SL, Jasper H, 2014. PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan. *Cell*, 156(1 – 2): 109 – 122.

Kaiko GE, Stappenbeck TS, 2014. Host-microbe interactions shaping the gastrointestinal environment. *Trends Immunol*., 35(11): 538 – 548.

Lee KA, Kim SH, Kim EK, Ha EM, You H, Kim B, Kim MJ, Kwon Y, Ryu JH, Lee WJ, 2013. Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell*, 153(4): 797 – 811.

Lee WJ, Brey PT, 2013. How microbiomes influence metazoan development: insights from history and *Drosophila* modeling of gut-microbe interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*., 29: 571 – 592.

Liu W, Jiang F, Bi X, Zhang YQ, 2012. *Drosophila* FMRP participates in the DNA damage response by regulating G2/M cell cycle checkpoint and apoptosis. *Hum Mol. Genet*., 21(21): 4655 – 4668.

Liu W, Yao W, Zhu WY, 2006. Reciprocal symbiosis between human body and the gut microbes. *World Chin. J. Dig*., 14(11): 1081 – 1088. [刘威, 姚文, 朱伟云, 2006. 人体与肠道微生物间的互惠共生关系. 世界华人消化杂志, 14(11): 1081 – 1088]

Liu W, Zhu WY, Yao W, Mao SY, 2007. Isolation and identification of a lactate-utilizing, butyrate-producing bacterium and its primary metabolic characteristics. *Acta Microbiologica Sinica*, 47(3): 435 – 440. [刘威, 朱伟云, 姚文, 毛胜勇, 2007. 一株乳酸利用、丁酸产生菌的分离与鉴定及代谢特性的初步研究. 微生物学报, 47(3): 435 – 440]

Ryu JH, Kim SH, Lee HY, Bai JY, Nam YD, Bae JW, Lee DG, Shin SC, Ha EM, Lee WJ, 2008. Innate immune homeostasis by the

homeobox gene *caudal* and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science*, 319(5864): 777 – 782.

Shimizu T, Ohtani K, Hirakawa H, Ohshima K, Yamashita A, Shiba T, Ogasawara N, Hattori M, Kuhara S, Hayashi H, 2002. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(2): 996 – 1001.

Shin SC, Kim SH, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, Yoon JH, Ryu JH, Lee WJ, 2011. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science*, 334(6056): 670 – 674.

Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F, 2011. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metab*., 14(3): 403 – 414.

Tremaroli V, Bäckhed F, 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415): 242 – 249.

（责任编辑：袁德成）